

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19550165  
 研究課題名（和文） 急速混合凍結EPR法によるシトクロムP450反応中間体の捕捉と動的解析の新展開  
 研究課題名（英文） Cryotrapped reaction intermediates in cytochrome P450 and kinetics analyses by newly developed rapid-freeze-quench EPR spectroscopy  
 研究代表者  
 堀 洋 (HORI HIROSHI)  
 大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授  
 研究者番号：20127294

**研究成果の概要：**サブミリ秒領域で酵素反応の進行を停止させ、捕捉した反応中間体を電子スピン共鳴法で検出・同定するため、再現性の良い急速混合凍結システムを開発した（不感時間 0.2 ms）。酸化型シトクロム P450cam と過酢酸の反応でポルフィリン $\pi$ カチオンラジカル中間体分子種の捕捉・同定に成功した。還元型 P450cam・電子供与体複合体と酸素分子との急速混合凍結実験で還元型ヘム鉄に結合している酸素分子が 1 電子還元されたペルオキシド型反応中間体分子種の捕捉に初めて成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連科学

キーワード：生物無機化学、シトクロム P450cam、一原子酸素添加反応、反応中間体、急速混合凍結装置、電子スピン共鳴、EPR

### 1. 研究開始当初の背景

生体内で起こる化学反応の多くは、金属を活性中心に持つ金属酵素によって触媒される。酵素反応における不安定な短寿命反応中間体分子種を捕捉し、同定する事は酵素の反応機構を研究する上で重要である。本課題研究では、サブミリ秒領域で酵素反応の進行を急速混合凍結法で停止させ、捕捉した反応中間体を電子スピン共鳴（EPR）法で検出する方法を採る。EPR法はラジカル種、金属イオンのスピン状態、金属中心の配位構造や周辺のマイクロ環境を敏感に反映するため、ラジカル

分子種や金属中心をもつ生体分子の研究に広く使われている。

シトクロムP450は種々の生理活性脂質ならびに薬・毒物などを代謝する一群のヘムタンパク質で、分子状酸素を活性化して基質に酸素原子を添加する一原子酸素添加反応を触媒する。シトクロムP450への電子伝達は電子供与体タンパク質である鉄-イオウタンパク質（フェレドキシン）によってなされる。数多くのシトクロムP450の中で最も構造と機能の解析が進んでいるのが基質カンファアの水酸化に参与するP450camである。

P450camへの直接の電子伝達は2Fe-2Sの複核中心を有するプチダレドキシン (Pdx) である。この反応サイクルにおいて、酸素分子結合型分子種 (オキシ体) は還元型Pdxによって一電子還元され、ペルオキシド中間体を経て基質が水酸化され、最初の休止状態に戻る。この反応は非常に速いため通常的手段では中間体は捕捉できない。Hoffmanらは極低温下で凍結させたオキシ体P450cam溶液に還元型Pdxを使わずに電子線を照射して生成された水和電子による還元反応を行いペルオキシド結合 $Fe^{3+}$ 低スピンEPR信号を観測した。更に、この分子種を短時間昇温し、反応を進める過程で生じる新しい中間体を捕捉し、反応機構を議論した。この実験系では酸化活性種である $O=Fe^{4+}$ ポルフィリン $\pi$ カチオンラジカル (Compound I) のEPR信号は検出されなかった。一方、過酸 (ROOH) を用いてこの反応を直接起こさせる (shunt pathway) 方法ではアミノ酸残基 (チロシン残基) 上のラジカル生成を示すEPRの報告がされているが、 $O=Fe^{4+}$ ポルフィリン $\pi$ カチオンラジカル (Compound I) のEPR信号が観測された報告例はない。

**何が問題か：**水和電子による還元も、本来の電子伝達タンパク質である還元型Pdxによる還元も化学反応としては同じ還元反応である。しかし、「室温において、還元型オキシ体P450camが還元型Pdxと1:1複合体を形成し、Pdxから電子を受け取って出来る反応中間体と、極低温で固定した酸素結合型へムに水和電子を投入して得られる中間体は果たして同じものか」と云う疑問に答える必要がある。そのためには、サブミリ秒領域で室温での酵素反応の進行を停止させ、急速凍結で捕捉した反応中間体を電子スピン共鳴法で検出できる再現性の良い「急速混合凍結システム」の構築が不可欠である。

## 2. 研究の目的

生体化学反応は酵素と基質を混合することで開始される。室温の反応における不安定な短寿命中間体分子種をサブミリ秒領域で捕捉・凍結してEPRで検出する手法は酵素反応の研究にとって不可欠である。本課題研究では、シトクロムP450camの反応中間体をEPRで検出しP450反応メカニズムの動的解析を行う事を目的とする。

短寿命反応中間体のEPRスペクトル測定を可能にするためには、短時間内に酵素と基質を混合し、さらに凍結して反応の進行を止め、中間体分子種を捕捉する必要がある。しかし、短時間内に溶液を混合し凍結する実験は難しく、従来の市販装置 (不感時間約5ms以上) では、サブミリ秒領域における高速生体反応の計測は全くできなかった。

(1) 申請者は従来の装置とは異なるデザインの急速混合凍結装置を既に開発している

が、混合凍結時間の再現性に難がある。再現性の高い安定な急速混合凍結装置の開発は不可欠である。反応の時間分割解析も可能にすることを旨とする。

(2) 実際のP450反応サイクルは酸素分子結合型P450 (オキシ体) と還元型Pdxが1:1複合体を形成してP450反応が進行する。試料を混合装置に導入するまでに要する時間とオキシ体P450cam単体の安定性を考慮すると、本装置でオキシ体P450camと還元型Pdxを実際のP450反応と同じ手順で反応させる事は難しい。そこで、本課題研究では、酸素分子がP450の還元型へム鉄に結合する事でPdxからの電子移動がスタートすると考え、還元型P450cam/Pdx1:1複合体を出発物質とし、これと酸素飽和緩衝液を急速混合凍結装置で反応させる方法を採用。混合凍結時間を変える事により、其々の中間体分子種のEPR信号強度の増減から反応の動的メカニズムを論ずる。

(3) 上記反応系は実際のP450反応スキームには出てこない。次のステップとして、1段目の混合装置 (ミキサー) で還元型P450camと酸素飽和溶液と反応させ (オキシ体の形成)、直ちに2段目のミキサーで還元型Pdxと反応させる2個のミキサーを備えた急速混合凍結装置を設計・製作する。本装置を用いて中間体の検出、解析を目指す。

(4) ペルオキシド反応中間体、ヒドロペルオキシド反応中間体分子種は酸化型P450と過酸 (ROOH) との反応によっても得られ、(shunt pathway反応) 特徴的な $Fe^{3+}$ 低スピンEPR信号が観測されるはずである。更にへム鉄に結合しているペルオキシドの $O-O$ 結合が切断され、Compound IのEPR信号の検出が期待できる。shunt pathway反応で、アミノ酸ラジカル (チロシンラジカル) 生成前の $O=Fe^{4+}$ ポルフィリン $\pi$ カチオンラジカル (Compound I) を急速混合凍結EPR法で捕捉・検出し、解析する。更にはCompound I生成前のペルオキシド、ヒドロペルオキシド- $Fe^{3+}$ 低スピン中間体の捕捉・検出を目指す。

(5) 極低温で安定化された還元型オキシ体P450camが水和電子で一電子還元されるとペルオキシド中間体が生成された実験結果から、オキシ体P450が一電子還元されるとペルオキシド中間体が生成するとの考えがP450の反応機構では一般的に認められつつあるが、急速混合凍結法で同じ中間体分子種が捕捉できるか否かの検証は重要である。

## 3. 研究の方法

(1) 試料標品の大量培養、分離、精製を行う。シトクロムP450cam、プチダレドキシン (Pdx) 及びP450cam/Pdx複合体の電子スピン共鳴 (EPR) を測定するため、大量の試料が必要である。野生型 (WT) P450cam、Pdxの試料は、

それらの発現ベクターを持った大腸菌を大量培養し、そこから分離、精製する。

(2) P450cam 変異体を作製する。P450cam のヘム遠位空間でプロトン供給に重要な働きをしている 251 番目のアスパラギン酸 (D) をアスパラギン (N) に置換した変異体 P450cam(D251N) では第 2 電子による還元後のプロトン供給速度が律速になっている事が報告されている (酸素結合型 P450cam が安定につくれる)。D251N 変異体を用いることによってオキシ体 P450cam が還元型 Pdx により一電子還元された状態のペルオキシド中間体の捕捉、EPR による信号検出が期待できる。また、252 番目トレオニン (T) をアラニン (A) に置換してプロトンが供給されない変異体 T252A の作製も考える。(「大阪大学組換え DNA 実験安全委員会」承認実験である。)

(3) 急速混合凍結装置の調整 (混合凍結時間の較正)・改良を行う。混合凍結時間は常に高い再現性が得られなければならない。従来の装置の問題点を明らかにし、改良する。急速混合凍結時間の更なる高速化を図る (100 マイクロ秒以下に挑戦するため、ミキサー部の改良)。更に、二段式ミキシング法の可能性を検討する。

(4) 還元型 P450cam/Pdx 複合体と酸素飽和緩衝液との急速混合凍結 EPR 実験を行う。

①還元型ヘム鉄に結合した酸素分子が還元型 Pdx からの電子によって還元され、ペルオキシド型が形成されると考えられている。この中間体分子種 ( $\text{Fe}^{3+}$  低スピン型) の EPR 信号が検出できる条件を探す。更に、ペルオキシド型にプロトンが付加されると、ヒドロペルオキシド型 EPR 信号の検出が期待できる。EPR 信号が検出できる条件を探す。②更に反応が進んだ時間領域ではヘム鉄に結合している活性酸素分子の O-O 結合が切断された状態 (Compound I) が形成され、ポルフィリン  $\pi$  カチオンラジカルあるいはアミノ酸残基上のラジカルの EPR 信号の検出が期待できる。その条件を探す。

(5) 酸化型 P450cam と過酸との反応 (shunt pathway) でポルフィリン  $\pi$  カチオンラジカルを補足する。P450 反応スキームにおける shunt pathway 反応で、過酸 (ROOH) を用いて酸化型 P450 から直接ペルオキシド中間体への反応を起こさせる。過酸としては過酸化水素、過酢酸、mCPBA 等を用いる。Trautwein らは基質非存在下での P450cam と過酸との反応で、チロシンラジカルの捕捉、EPR による解析を報告しているが、ポルフィリン  $\pi$  カチオンラジカルを含む Compound I は検出していない。本課題研究ではチロシンラジカル生成前に存在する Compound I ポルフィリン  $\pi$  カチオンラジカルの捕捉、EPR による検出・同定、定量的な解析を目指す。他方、基

質存在下で反応中間体を検出する事は難しいと言われている。基質あるいは基質類似物質存在下での Compound I 反応中間体の捕捉・検出、解析する。

#### 4. 研究成果

(1) 試料標品の大量培養、分離、精製：シトクロム P450cam、プチダレドキシシン (Pdx) 及び P450cam/Pdx 複合体の電子スピン共鳴 (EPR) を測定するため、大量の試料が必要である。野生型シトクロム P450cam、Pdx の試料標品はそれらの発現ベクターを持った大腸菌を大量培養し、分離、精製した。

(2) P450cam 変異体の作製：P450cam のヘム遠位空間でプロトン供給に重要な働きをしている 251 番目のアスパラギン酸 (D) をアスパラギン (N) に置換した変異体 P450cam (D251N)、252 番目のトレオニン (T) をアラニン (A) に置換してプロトンが供給されない T252A 変異体及びセリン (S) に置換した T252S 変異体の作製を行った。これら P450cam 変異体試料標品の作製に関する研究は既に進めてきており、DNA 組換え実験に関する技術・設備上の問題はなかった。DNA 組換え実験としては「大阪大学組換え DNA 実験安全委員会」で承認済みである。

(3) 急速混合凍結装置の改良：短寿命反応中間体 EPR スペクトルの測定には、短時間内に酵素と基質を混合し、さらに凍結して反応の進行を止め、中間体分子種を捕捉する再現性の高い混合装置の開発が必要である。従来型の急速混合凍結装置では凍結時間の再現性に問題があった。反応液を押し出すシリンジ式押し出しシステムを HPLC のポンプシステムに変更することで安定な流量の確保を可能にした。更に 77K 下で EPR 測定用試料管に凍結試料を確実に導入できる方法を考案した。 $\text{metMb} + \text{NaN}_3 \rightarrow \text{MbN}_3$  反応を用いて、混合凍結時間の較正をおこなった。反応時間  $t$  は  $t = \ln\{(1-a)^{-1}\} / (k' [\text{NaN}_3])$  より求めた。 $k' = 7 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、 $a = [\text{MbN}_3] / [\text{Mb}]$  である。 $a$  は時間  $t$  における  $\text{MbN}_3$  の EPR 信号強度と凍結試料を溶解して完全に  $\text{MbN}_3$  にしたときの信号強度との比より求めた。

再現性の高い凍結時間 (dead time が 0.2 ms) の新しい急速混合凍結装置を完成させた。

(4) Shunt pathway 反応でポルフィリン  $\pi$  カチオンラジカル分子種を補足する実験：pH 7.4 のリン酸カリウム緩衝液中の基質非結合型 P450cam (1 mM) と過酢酸 (2 mM) との混合凍結実験をおこなった。反応時間 1 ms では典型的なチロシンラジカルの EPR 信号が得られた。0.2 ms 領域では図 1 の赤線スペクトルで示すような特異な EPR 信号の検出に成功した。このスペクトルはチロシンラジカルと線幅の広い信号の混ざりであることを示している。この線幅の広い EPR 信号のマ

マイクロ波強度依存性は飽和し難い性質を示した。これはポルフィリン  $\pi$  カチオンラジカルに特徴的な性質である。

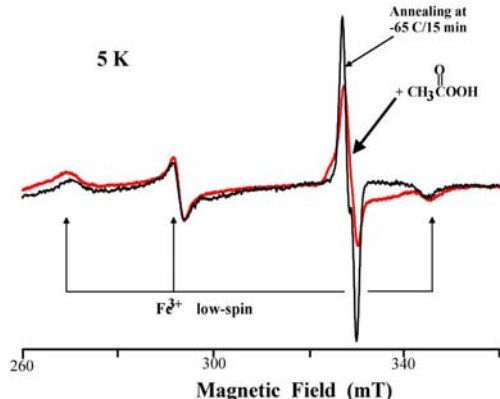


図1 基質非結合型 P450cam と過酢酸を 1 : 2 で混合凍結 (0.2 ms) した試料の EPR スペクトル (測定温度 5K)

次に、分子内電子移動を調べることを目的に測定試料の温度を  $-65^{\circ}\text{C}$  に昇温 (15 分間) した後、再び 5K で EPR を測定した。線幅の広い特異なラジカル信号は消失し、チロシンラジカルの信号強度の増大が認められた (黒線スペクトル)。この昇温実験で過酢酸と未反応の  $\text{Fe}^{3+}$  低スピン分子種の信号強度に変化が見られないことから  $-65^{\circ}\text{C}$  では過酢酸と P450cam の反応は進行せず、ラジカルの分子内移動のみが起こることが分かる。

0.2 ms ~ 1 ms 領域の急速混合凍結 EPR 法を用いて、チロシンラジカル生成前の P450cam 反応中間体分子種の検出に初めて成功した。この反応中間体分子種はスペクトルの線形、温度依存性、マイクロ波強度依存性からチロシンラジカル生成前にその存在が示唆されていた  $0=\text{Fe}^{4+}$  ポルフィリン  $\pi$  カチオンラジカル (Compound I) であることを強く示している。しかし、 $0=\text{Fe}^{4+}$  ポルフィリン  $\pi$  カチオンラジカル (Compound I) 前段階の反応中間体分子種であるペルオキシド結合型  $\text{Fe}^{3+}$  低スピン中間体分子種 (Compound 0) の捕捉・検出には成功しなかった。

(5) WT還元型 P450cam/Pdx 複合体と酸素飽和緩衝液との急速混合凍結 EPR 実験: 試料を混合装置に導入するまでに要する時間と酸素結合型 P450cam 単体の安定性を考慮すると、酸素結合型 P450cam と還元型 Pdx を実際の P450 反応スキームと同じ手順で反応させる事は極めて難しい。そこで、本実験では WT還元型 P450cam/Pdx 1 : 1 複合体を出発物質とし、これに分子状酸素を結合させ、反応を開始させる方法を採用した。

① 図2に示すように反応時間 0.5 ~ 1 ms で  $g \sim 2$  付近に特異なラジカル信号が初めて観測された (赤線で示した 5K での EPR スペクトル)。この反応中間体分子種はスーパーオキ

シド ( $\text{O}_2^-$ ) 由来のラジカル信号と類似し、この反応中間体分子種の電子状態が  $\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2^-$  である可能性を示している。この信号は反応時間 3 ms までに急速に消失した。

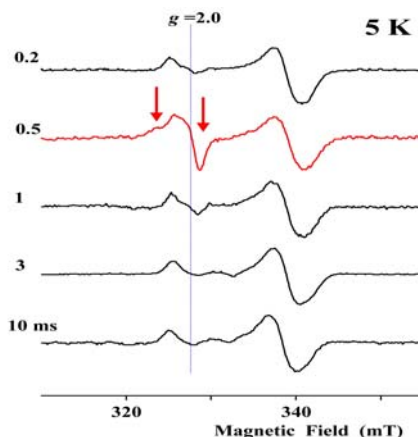


図2 還元型 P450cam/Pdx と  $\text{O}_2$  の反応

本 EPR 信号が P450 反応由来のものであるかを調べるため、還元型 P450、還元型 Pdx と酸素飽和緩衝液との急速混合凍結 EPR 実験を行ったところ、いずれも 0.5 ms 反応時間で図2と同様な EPR 信号 ( $g \sim 2$ ) を示した。したがって、還元ヘム鉄に結合した酸素分子が一電子還元された電子状態  $\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2^-$  は否定された。鉄を含まない反応系では観測されなかったことはこの反応には鉄イオンが関与していることを示している。

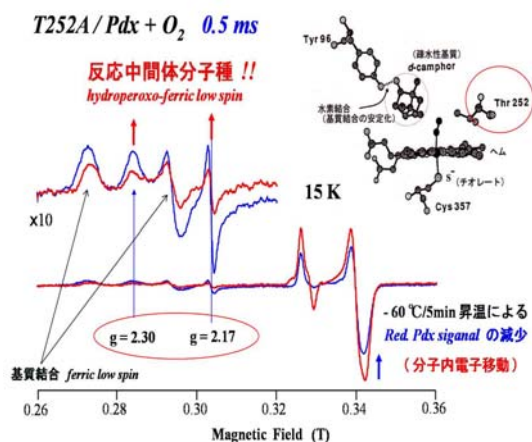
② 次に、反応時間を遅くすると 10ms では水酸化カンファー (プロダクト) の結合を示す  $g=2.48$  の  $\text{Fe}^{3+}$  低スピン EPR 信号強度の増加が 15K で観測された。同様の信号は 0.5 ms で急速混合凍結した試料を  $-60^{\circ}\text{C}$  で 5 分間 昇温すると分子内電子移動により得られた。しかし、ペルオキシド結合型分子種やポルフィリン  $\pi$  カチオンラジカル由来の EPR 信号は全く検出されなかった。

③ 重水 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) の効果: 試料中の  $\text{H}_2\text{O}$  を重水  $\text{D}_2\text{O}$  に置換することでプロトンの供給を遅らせることができ、ペルオキシド型やヒドロペルオキシド型 P450cam 反応中間体分子種の捕捉できるのではないかと考えた。緩衝液の組成はこれまでと同じで (pD 7.4)、試料側、酸素飽和緩衝液側ともに  $\text{D}_2\text{O}$  を用いた。0.5 ms で混合凍結させて EPR 測定を行った (15K)。信号強度は非常に小さいが  $g=2.17$  付近に新しい信号が観測された。この信号は  $-60^{\circ}\text{C}$  の昇温実験で消滅した。既に報告されているペルオキシド型 ( $g=2.25, 2.17, 1.96$ ) かヒドロペルオキシド型 ( $g=2.29, 2.17, 1.96$ ) 反応中間体の EPR 信号と対応している。P450cam/Pdx 複合体と酸素分子の急速混合凍結 EPR 法で、 $\text{D}_2\text{O}$  を用いることによって初めてペルオキシド型もしくはヒドロペルオキシド型反応中

間体の捕捉に成功したといえる。

④ pH による効果：酸化型 P450cam と過酸を反応させる shunt pathway 反応では pH 変化によって反応速度に差異が認められるので、試料の pH を 6.2~8.6 に各々調整して急速混合凍結時間を 0.5 ms に固定して実験を行った。低 pH ではカンファー結合酸化型 P450cam の低スピン EPR 信号が顕著に認められたが、高 pH では観測できなかった。pH が低くなると反応が早く進み、反応サイクル後の基質再結合酸化型 P450cam 分子種が観測されたことを示している。反応速度には明らかな pH 効果が見られたが、ペルオキシド反応中間体の捕捉は出来なかった。

⑤ T252 変異体 P450cam の結果：T252A、T252S 変異体について調べた。T252A ではトレオニンの  $\gamma$ OH 基が欠損しているため酵素活性が失われ、過酸化水素が生成されるのでヒドロペルオキシド型中間体の捕捉が可能になる。T252S ではアミノ酸側鎖に OH 基は存在するが、立体構造の違いから活性が減少する。野生型 (WT) に比べると、T252A では 6%、T252S では 81% に活性が落ちることが報告されている。T252A では、0.5 ms 混合凍結でヒドロペルオキシド型中間体の EPR 信号 ( $g=2.30, 2.17, \dots$ ) の観測に初めて成功した (図 3)。



試料を  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 5 分間昇温すると分子内電子移動により還元型 Pdx の減少とヒドロペルオキシド信号の増加がみられた。更に昇温実験を続けると、水酸化カンファー (プロダクト) 結合型の生成は観測されず、基質結合型 P450cam の信号強度の増加のみが観測された。一方、T252S 変異体では、僅かにヒドロペルオキシド型 P450cam 中間体由来の  $g=2.17$  信号が観測されたが、基本的には野生型 P450cam の結果と大きな差は見られなかった。

⑥ P450cam 変異体 D251N の結果：この変異体ではプロトンの供給が抑制されるため、ペルオキシド型 P450cam 中間体の捕捉が期待され

た。混合凍結は 0.5 ms で行ったがペルオキシド型 P450cam 中間体を捕捉することは出来なかった。しかし、 $g_z=2.50, g_y=2.30$ , ( $g_x$  は Pdx の信号と重なるため観測不可) に新しい  $\text{Fe}^{3+}$  低スピンヘム由来の EPR 信号が観測された。昇温実験 ( $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) でも変化が小さく、非常に安定な中間体分子種である。更に  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  まで昇温すると (10 分間) この信号は消失し、水酸化カンファー及びカンファー結合酸化型 P450cam の低スピン EPR 信号が観測された。これらの結果から、 $g=2.50, 2.30$  に見られる EPR 信号はペルオキシド、ヒドロペルオキシド型、更には Compound I 以降に生成される分子種で、プロダクト結合型 ( $g=2.48$ ) 以前の反応中間体由来の分子種であると言える。オキシ体が安定であることを考えると、混合・凍結時間をもっと遅くすべきであった。しかし、試料量の問題で今回はこれ以上の実験遂行は出来なかった。

(6) 今後の課題：還元型 P450cam と酸素分子との結合反応が充分でないため、中間体分子種の信号強度が充分にとれなかった。これを解決するための二段式ミキサーの作製に至らなかった。今後の課題である。急速混合凍結 EPR 法の更なる改良、成果が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

堀 洋、金属タンパク質の電子常磁性共鳴 (EPR) 測定をしようとする人のために、蛋白質科学会アーカイブ (Web 公開誌)、1 #037, p. 1-71、2008 年、査読有

[学会発表] (計 1 件)

堀 洋、急速混合凍結 EPR 法による P450cam 反応サイクルにおける新しい反応中間体の観測、日本生物物理学会 第 45 回年会 2007 年 12 月 21 日、パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 洋 (HORI HIROSHI)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授  
研究者番号：20127294

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし